Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med K. Holldack)

DIE EINWIRKUNG VON DEXAMETHASONSULFAT AUF MENSCHLICHES KNOCHENMARK IN VITRO

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Gerd Wilde
aus Berlin

1974

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med K. Holldack)

DIE EINWIRKUNG VON DEXAMETHASONSULFAT AUF MENSCHLICHES KNOCHENMARK IN VITRO

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Gerd Wilde
aus Berlin

Referent: Professor Dr. Irene B o l l
Korreferent: Professor Dr. Hermann Michel

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

UNIV. LEIDEN BIBL.

Promoviert am: 24. Juni 1974

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

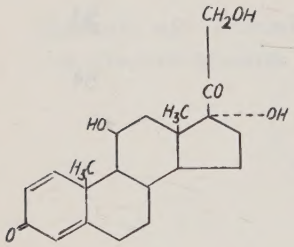
I N H A L T

	Seite
Einleitung	4
Fragestellung	8
Methode	8
Ergebnisse	13
Zusammenfassung der Ergebnisse	49
Diskussion	51
Zusammenfassung	53
Literatur	54

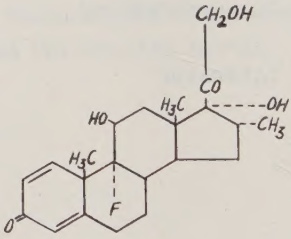
E I N L E I T U N G

Seit der Einführung der Corticoid-Behandlung durch Hench [21] haben ACTH und Corticosteroide eine immer größere Bedeutung in der Therapie vieler Erkrankungen erlangt. Leider waren die Nebenwirkungen von dem zunächst verwendeten Cortison wie Eiweißverlust, Hypertonie, Natrium- und Wasserretention sowie psychische Störungen sehr schwerwiegend. So versuchte man, das Cortisonmolekül so zu verändern, daß die therapeutische Wirkung stärker, die Nebenwirkungen aber schwächer wurden.

1955 dehydrierten amerikanische Forscher Cortison und Hydrocortison zu Prednison und Prednisolon. Durch Einführung eines Fluoratoms in 9-alpha-Stellung und einer Methylgruppe in 16-alpha-Stellung in das Prednisolonmolekül gelangte man schließlich 1958 zur Darstellung des Dexamethasons.

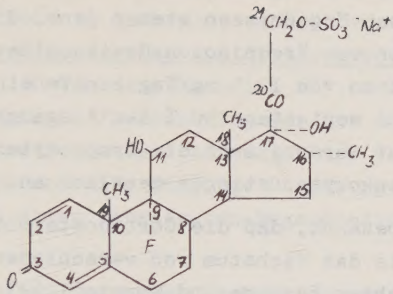


P R E D N I S O L O N



D E X A M E T H A S O N
(9α-Fluor-16αmethyl-prednisolon)

Dexamethason ist ein synthetisches Cortisolderivat und hat wie alle Corticoide der Nebennierenrinde (d.h. der Glucocorticoide und der Mineralcorticoide) ein gemeinsames Grundgerüst und zwar das Pregnanskelett mit 21C-Atomen. Das in dieser Arbeit verwendete Präparat ist Dexamethasonsulfat oder besser Dexamethasonhemisulfat-Na. Dabei handelt es sich um einen Ester, welcher gut wasserlöslich und in diesem Zustand auch sterilisierbar ist [22].



D E X A M E T H A S O N S U L F A T
(Dexamethason-hemisulfat-Na)

Nach klinischen Untersuchungen soll Dexamethason etwa 4 - 5 mal stärker entzündungshemmend und antiproliferativ als Triamcinolon, 7 - 10 mal stärker als Prednison und Prednisolon und 30 - 40 mal stärker als Hydrocortison oder Cortison sein. Diese starke Aktivitätssteigerung ergibt sich durch die Einführung des Fluoratoms und der Methylgruppe.

Neben der Steigerung der Glukokortikoid-Aktivität konnte man die unerwünschte mineralotrope Aktivität herabsetzen: eine Natrium- und Wasserretention bewirkt Dexamethason nicht; der Kalium- und Natriumspiegel beim Menschen wird selbst bei längerer Therapie mit 5 - 10 mg Dexamethason pro Tag nicht wesentlich verändert. Es hat aber einen starken Einfluß auf die Psyche des Menschen und hemmt von allen bekannten Kortikoiden am stärksten die Hypophyse.

Nach Okuda und Zicha ist bekannt, daß Dexamethason in der Lage ist, eine Verminderung der eosinophilen Leukozyten im Blut herbeizuführen [29,41]. Hitzenberger und Kurka [22] stellten dagegen fest, daß weder die Injektion von 2,5 noch von 5 und 10 mg Dexamethasonhemisulfat i.v./Tag beim Menschen einen Abfall der

eosinophilen Blutzellen und Lymphozyten zur Folge hat und daß die neutrophilen Leukozyten nicht wesentlich ansteigen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen jene, die durch die intravenöse Injektion von Prednisolon-Hemisuccinat erhalten wurden. Nach der Injektion von 12,5 mg/Tag konnte ein eindeutiger Eosinophilensturz um wenigstens 50 % des Ausgangswertes, im Mittel um 70 %, erreicht werden; auch die Lymphozyten sanken ab und die neutrophilen Leukozyten stiegen deutlich an.

Weiterhin ist bekannt, daß die Corticosteroide die Mitoseaktivität [10] sowie das Wachstum von verschiedenen Geweben vermindern. So erreichten Baserga und Morsiani [2] eine Atrophie des lymphatischen Gewebes bei Mäusen durch hohe Dosen von Prednison (180 mg/die). Elves und Torney [15,38] führten in vitro-Versuche mit Prednisolon an menschlichen Lymphozyten durch. Nach Corticosteroidzusatz wurden die lymphatischen Zellen in der Kultur vermindert.

Von anderen Autoren [31,34,36] wird übereinstimmend von der proliferationshemmenden Wirkung der Corticosteroide auf Fibroblastenkulturen berichtet.

Daß die Corticosteroide nicht nur einen wachstumshemmenden Einfluß besitzen, glaubten mehrere Autoren. Insbesondere Farnes und Barker [16] erzielten in vitro eine gesteigerte Proliferation von menschlichen Fibroblasten und Knochenmarkzellen bei der Dosierung von 0,5 - 5 mg/ml Prednisolon während 2 - 5 Tagen. Durch die Arbeiten von Rasche [32], Rozen [33], Undricov [39] und Macieira [25] wurde der wachstumshemmende Effekt von Cortisol in Frage gestellt. Sie behaupteten, daß es bei bestimmten niedrigen Dosierungen zu einer Wachstumsförderung von Fibroblasten sowohl von Mäusen, Ratten als auch Menschen kommen würde.

Gilette und Buchsbaum [18] konnten bei in vitro-Untersuchungen eine vergrößerte Wachstumsrate von embryonalen Hühnerfibroblasten bei Konzentrationen unter 30 µg/ml Desoxycorticosteron feststellen. Das Maximum der Stimulation wurde bei 7,5 µg/ml erreicht.

Der Einfluß der Corticosteroide auf die Proliferationskinetik der humanen Granulopoese und Erythropoese ist bisher noch nicht ganz abgeklärt. Mehrere Autoren berichten von einer Proliferationshemmung der Granulopoese und Erythropoese durch Cortison bzw. Prednisolon in Tierversuchen [11,23]. Auch beim Menschen [28] konnte durch hohe Prednisolongaben von 1,5 bis 4 mg/kg Körpergewicht eine Regenerationshemmung der Granuloblasten erzielt werden, während eine niedrige Dosierung von 0,75 mg/kg Körpergewicht zu einer verstärkten Regeneration der Granuloblasten führte.

Zu entgegengesetzten Untersuchungsergebnissen, nämlich einer Proliferationsförderung der Granulopoese durch Cortisol (0,05 mg/g Ratte und Tag), kamen Morrison und Toepfer [27] in ihren in vivo-Untersuchungen an Ratten. Ebenfalls im Tierversuch wurde durch Cortisol- (0,008 mg/g Ratte und Tag) und ACTH-Gaben (4 bzw. 10 IE/kg Kaninchen und Tag) eine Proliferationsförderung der Erythropoese beobachtet [17,20,30].

Boll und ihre Mitarbeiter [6] stellten bei ihren in vitro-Untersuchungen an menschlichen Knochenmarkzellen fest, daß nur bei einer relativ hohen Konzentration von 250 mg % Prednisolon eine Proliferationsförderung der Granulopoese zu erzielen war, bei niedrigeren Konzentrationen wie 25 mg % und 2,5 mg % eine Proliferation jedoch nur in einzelnen Kulturen minimal nachzuweisen war. In der Erythropoese kam es nur bei normalem Knochenmarkbefund zu einer Reifungsbeschleunigung.

Weissenfels, Boll sowie U. und B. Christoph [13,14,40] berichten in ihren Veröffentlichungen, daß durch den Zusatz von nur 0,25 µg/ml Prednisolonacetat sowie Triamcinolon zur Knochenmarkkultur jeweils eine Hemmung der Proliferation der Erythropoese - weniger der Granulopoese - in vitro erreicht wird. Die retikulären Zellen werden vermindert, die lymphatischen Zellen dagegen vermehrt.

Bei der gleichen Zusatzkonzentration von 0,25 µg/ml Prednisolonsulfat zur Knochenmarkkultur wurde nach neueren Untersuchungen von A. Schellack [35] eine Reifungsstimulation der Erythropoese

erreicht; bei der Granulopoese konnte er eine schwache Reifungshemmung feststellen.

C. Glöckler [19] konnte dagegen weder bei der Erythropoese noch bei der Granulopoese einen Einfluß durch 0,25 µg/ml Corticosteron erkennen.

F R A G E S T E L L U N G

Aus der oben angegebenen Literatur war zu entnehmen, daß frühere Ergebnisse, die sich zum größten Teil auf in vivo-Untersuchungen stützen, sehr unterschiedlich waren. Deshalb wurde in einer Reihenuntersuchung mit verschiedenen Cortisonderivaten bei gleicher Konzentration (0,25 µg/ml Kultur) die Wirkung auf menschliches Knochenmark in vitro untersucht [13,14,19,35,40].

In der hier vorliegenden Arbeit sollte im Rahmen dieser Untersuchungen das Cortisolderivat Dexamethasonsulfat geprüft werden. Hierbei sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit prinzipiell die Proliferation der Knochenmarkzellen durch dieses Corticoid ohne direkten Bezug zu einem bestimmten hämatologischen Krankheitsbild beeinflußt werden kann.

M E T H O D E

Nach der Carrel'schen Technik, modifiziert von Boll, wurden Kulturen von dem Knochenmark von 5 Patienten, die nicht unter einer Corticosteroid-Therapie standen und keine Leukämie hatten, im hängenden Koagulum angefertigt [4,5].

Auf ein unter sterilen Bedingungen hergestelltes Koagulum, welches aus 5 Teilen Eigenplasma, 3 Teilen Eigenserum, 1 Teil Corhormon$^{(R)}$ und 1 Teil Dexamethasonsulfat-Lösung (0,25 µg/ml)*

---

*Die Lösung stellte uns dankenswerter Weise die Fa. Schering AG her.

besteht, wird ein Bröckchen Knochenmark gesetzt. Dann wird der Koagulumtropfen, welcher sich auf einem Objektträger befindet, mit einem Serumtröpfchen bedeckt. Anschließend wird mit Vaseline über dem Koagulum ein Hohlschliffobjektträger befestigt und die nun fertige Kultur umgedreht. Mit Hartparaffin werden die Deckglasränder luftdicht verschlossen. Danach erfolgt die Inkubation im Brutschrank bei +37° C. Die gleiche Menge Kontrollkulturen (enthalten kein Dexamethasonsulfat) wird mit 4 Teilen Eigenserum angesetzt. Nach 24, 48 und 72 Stunden werden von je 3 Kulturen Ausstriche angefertigt und nach der Färbemethode von Pappenheim gefärbt.

So ergeben sich mit dem Originalpunktatausstrich pro Versuch 7 Ausstriche. Die Differenzierung der einzelnen Zellen des menschlichen Knochenmarkes erfolgt nach Boll [8].

Bei der mäanderförmigen Zählung der Zellen der Erythro- und Granulopoese wurden die aufgelockerten Randgebiete der Präparate bevorzugt, um größtmögliche Genauigkeit bei der Differenzierung der einzelnen Zellformen zu erreichen.

Von jedem Präparat wurden möglichst 2 000 Zellen gezählt, so daß dem Gesamtergebnis etwa 70 000 gezählte Zellen zu Grunde liegen.

Das aus den Untersuchungen erhaltene Zahlenmaterial wurde wie folgt ausgewertet:

1. Darstellung der Reifungskurven nach der prozentualen Verteilung der verschiedenen Reifestadien der Granulo- und Erythropoese in Abhängigkeit von der Kulturdauer.
2. Das Verhältnis der Zellzahlen von Granulo- zur Erythropoese findet seinen Ausdruck im G/E-Index.
3. Das Verhältnis der sich in einer Mitosephase befindenden Zellen zur Gesamtzahl der teilungsfähigen Zellen drückt der Mitoseindex in pro mille aus.
4. Zur Darstellung der prozentualen Verteilung der Mitosephasen wurden karyologische Kurven angefertigt.

S I G N I F I K A N Z B E R E C H N U N G*

Hierbei muß ein mathematisch-statistisches Verfahren gewählt werden, das dazu geeignet ist, beim Vergleich zweier Zahlenreihen mit höchster Wahrscheinlichkeit festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zahlenreihen besteht oder nicht. Geeignet ist das χ^2-Verfahren, das jeweils für die Erythropoese sowie für die retikulären und lymphopoetischen Zellen angewendet wurde. Bei der Granulopoese führten wir keine Signifikanzberechnung durch, da die Ergebnisse der Versuchsreihe zu unterschiedlich ausfielen (siehe Mittelwertskurve Abb. 6).

Die errechneten χ^2-Werte für die entsprechenden Stichproben sind aus den anschließenden Tabellen zu entnehmen. Aus einer logarithmischen Kurve wird dann unter Berücksichtigung der entsprechenden Freiheitsgrade der Wahrscheinlichkeitswert p abgelesen. Ist er kleiner als 0,05, kann von statistischer Signifikanz gesprochen werden.

Eine nähere Erläuterung des χ^2-Testes findet man bei Belitz [3] und Cavalli-Sforza [12].

---

*Für die Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse bin ich Herrn Prof. Dr. H. Belitz, vom Institut für Genetik der FU Berlin, zu Dank verpflichtet.

Beispiel für die Signifikanzberechnung

Fall V Erythropoese 24^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle + Zusatz	p
PE	13	9	22	0,03
bE	34	31	65	0,08
pE	95	81	176	0,23
oE	3		3	
rE	98	412	510	0,66
	n_1= 243	n_2= 533	n_{ges}= 776	1,00

Zelltyp	$E_{Kontrolle}$	E_{Zusatz}	$(B-E)^2/E_{Kontr.}$	$(B-E)^2/E_{Zusatz}$
PE	7,29	15,99	4,47	3,06
bE	19,44	42,64	10,9	3,18
pE	55,89	122,59	27,37	14,11
oE				
rE	160,38	351,78	24,26	10,31
	n_1= 243	n_2= 533	χ^2_3= 67	χ^2_3= 30,66

$$\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E}$$

$(B-E)^2 / E_{ges.}$

PE 7,53
bE 14,08
pE 41,48
oE
rE 34,57

χ^2_3= 97,66

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

E = Erwartungswert = $P \cdot n_1 = 0,03 \cdot 243 = 7,29$

B = Beobachtungswert = Kontrolle

p = Wahrscheinlichkeitswert = $\frac{\text{Kontr. + Zusatz}}{n_{gesamt}} = \frac{22}{776} = 0,03$

Erläuterungen zu den Abbildungen 1 - 6

Abszisse: Die prozentuale Verteilung der Reifestadien ist getrennt für Erythro- und Granulopoese additiv aufgetragen.

Zellen der Erythropoese in %:

PE = Proerythroblasten
bE = basophile Erythroblasten
pE = polychromatische Erythroblasten
oE = oxyphile Erythroblasten
rE = reife Erythroblasten

Zellen der Granulopoese in %:

Mb = Myeloblasten
Prom = Promyelocyten
Myel = neutrophile Myelocyten
eM = eosinophile Myelocyten
bM = basophile Myelocyten
Mob = Monoblasten
MM = Metamyelocyten
St = Stabkernige
Sg = neutrophile Segmentkernige
eSg = eosinophile Segmentkernige
bSg = basophile Segmentkernige
Moc = Monocyten

——— = Kontrollkulturen
------- = Dexamethasonsulfat-Kulturen

Ordinate: Oben mit dem Original als Stunde Null beginnend, folgt nach unten die Kulturdauer nach 24, 48 und 72 Stunden.

Die Zellarten der Erythro- sowie Granulopoese, die weniger als 1 % betrugen, wurden nicht berücksichtigt.

E R G E B N I S S E

Versuch I: Knochenmark der Patientin F.B., 81 Jahre: ca. normal

Klinische Diagnose:	Hypochrome Anaemie bei chronischer Pyelonephritis. Zustand nach Apoplexie
Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:	Bactrim(R) 2 x 2 Tbl. Lanicor(R) 0,125 mg/die Pepsaletten-Saft 3 x 1 Eßl. Kobalt-Ferrlecit(R) 80 mg/die 3 x 1 Pilocarpin-Augentropfen 2 % Zur Nacht: 2 % Pilocarpol(R)-Augentropfen
Blutbild am Tage der Sternalpunktion:	Hb = 6,6 g %, Erythrocyten = 3,04 Mill/µl Hb_E= 21,7 pg, Thrombocyten = 162 000/µl Retikulocyten = 15 ‰ Leukocyten = 7600/µl, Eosinophile = 1 % Stabkernige = 2 %, Segmentkernige = 53 % Lymphocyten = 38 %, Monocyten = 6 %

BSG: 54/85 mm n.W.

	Kontrollen				Zusatz		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	2,9	2,3	1,3	1,8	4,8	1,8	1,4
II	11,6	5,1	9,7	2,5	7,8	12,7	7,8
III	2,1	2,3	2,5	8,4	1,1	4,6	10,0
IV	2,3	2,8	2,6	2,0	3,4	2,3	1,9
V	5,0	6,2	7,4	7,3	2,4	3,1	5,2
Summe	23,9	18,7	23,5	22,0	19,5	24,5	26,3
Mittelwert	4,8	3,7	4,7	4,4	3,9	4,9	5,3

Tabelle 1: G/E-Indices

	Kontrollen				Zusatz		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	21,0	9,8	7,3	0	14,5	19,1	0
II	54,3	15,3	0	0	16,5	0	0
III	32,4	21,9	14,5	0	22,1	16,6	0
IV	5,8	7,0	17,1	12	11,1	12,0	25
V	13,2	13,8	0	0	24,8	0	0
Summe	126,7	67,8	38,9	12	89,0	47,7	25
Mittelwert	25,3	13,6	7,9	2,4	17,8	9,5	5

Tabelle 2: Mitoseindices für die Erythropoese in ‰

	Kontrollen				Zusatz		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	20	15,3	11,9	0	14,0	15,3	0
II	8,7	16,6	5,3	9,9	3,6	2,9	0
III	21,5	8,2	9,2	9,0	14,7	16,5	10,7
IV	14,9	23,1	1,9	11,1	19,5	6,4	24
V	17,3	20,3	3,4	7,6	20,0	13,8	8,7
Summe	82,4	83,5	31,7	37,6	71,8	54,9	43,4
Mittelwert	16,5	16,7	6,3	7,5	14,3	10,9	8,7

Tabelle 3: Mitoseindices der Granulopoese in ‰

Fall 1 : F.B.

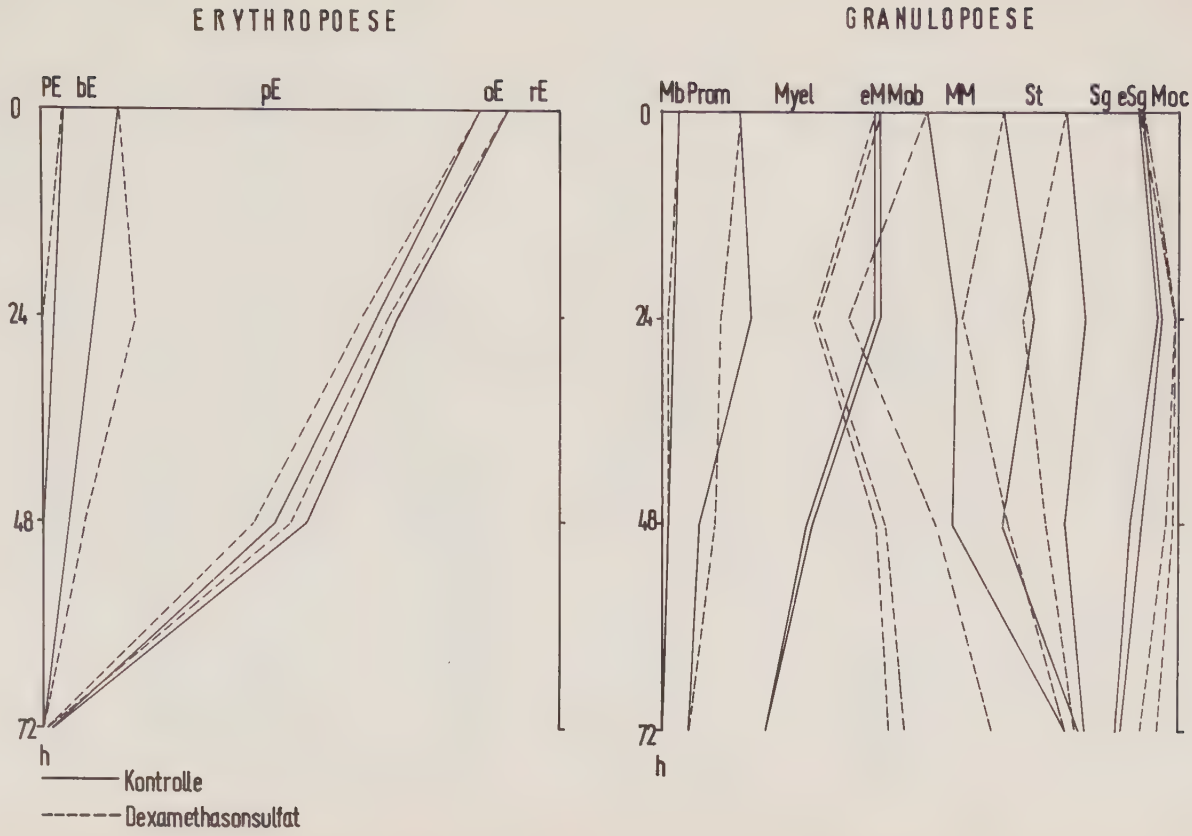


Abb. 1

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 1):

Es fällt für alle drei Kulturtage eine leichte Linksverschiebung der Kurve für reife Erythroblasten bei den Hormonzusatzkulturen auf, die nur bei 72 Stunden nicht statistisch signifikant ist (Tabelle 4.1).

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 1):

Die 24-Stunden-Zusatzkultur zeigt eine Linksverschiebung mit Zunahme reifer Zellformen, während die 48- und 72-Stunden-Kulturen eine Rechtsverschiebung zeigen.

3. G/E-Index (Tabelle 1):

Die G/E-Indices liegen in den Zusatzkulturen bei 24 und 48 Stunden höher als in den Kontrollen.
Nach 72 Stunden findet man im Zusatzpräparat einen etwas niedrigeren G/E-Index im Vergleich mit dem entsprechenden Kontrollindex.

4. Mitoseindices (Tabelle 2, 3):

Die Mitoseindices für die Erythropoese zeigen nach 24 und 48 Stunden eine ziemlich starke Erhöhung zugunsten der Zusatzpräparate; nach 72 Stunden sind keine Mitosen zu sehen.

Der weiße Mitoseindex läßt nach 24 Stunden kaum einen Unterschied zwischen Kontrolle und Zusatz erkennen. Nur nach 48 Stunden steigt der Index unter Dexamethasonsulfat-Einfluß erheblich an.

Im 72-Stunden-Ausstrich waren - wie in der Erythropoese - keine Mitosen zu sehen.

Fall I Erythropoese

24^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	9	1	3,26
bE	45	54	16,99
pE	314	136	4,50
oE	27	16	0,12
rE	179	102	0,22
	n_1= 574	n_2= 309	χ^2_4= 25,09

$p = 5 \cdot 10^{-5}$ (signifikant)

48^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
pE	319	218	4,17
oE	50	44	0,49
rE	395	346	0,93
Rest	43	52	4,49
	n_1= 807	n_2= 660	χ^2_3= 10,08

p = 0,018 (signifikant)

72^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
rE	292	214	0,03
Rest	6	2	1,25
	n_1= 298	n_2= 216	χ^2_1= 1,28

p = 0,26 (nicht signifikant)

Tabelle 4.1

Versuch II: Knochenmark der Patientin M.D., 59 Jahre:

ca. normal bis auf verminderte Erythropoese

Klinische Diagnose: Zustand nach Kompressionsfraktur des 3. LWK und Entlastungslaminektomie bei bekanntem Retothelsarkom, wobei zur Zeit kein Anhalt für ein Rezidiv bestand.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:
Spasmo-Cibalgin(R)-Supp. 2 x 1
Adumbran(R) 5/5/10 mg/die
Lanicor(R) 1 x 0,25 mg
Valium(R) 10 mg/die
Atropin 3 x 1/2 mg/die
Endoxan(R) Drg. 100 mg

Blutbild am Tage der Sternalpunktion:
Hb = 10,6 g %, Erythrocyten = 3,6 Mill/µl
Hb_E= 29,4 pg, Fe im Serum = 28 gamma-%
Leukocyten = 7400/µl, Basophile = 2 %
Stabkernige = 7 %, Segmentkernige = 78 %
Lymphocyten = 7 %, Monocyten = 6 %

BSG: 52/80 mm n.W.

Fall 2: MD.

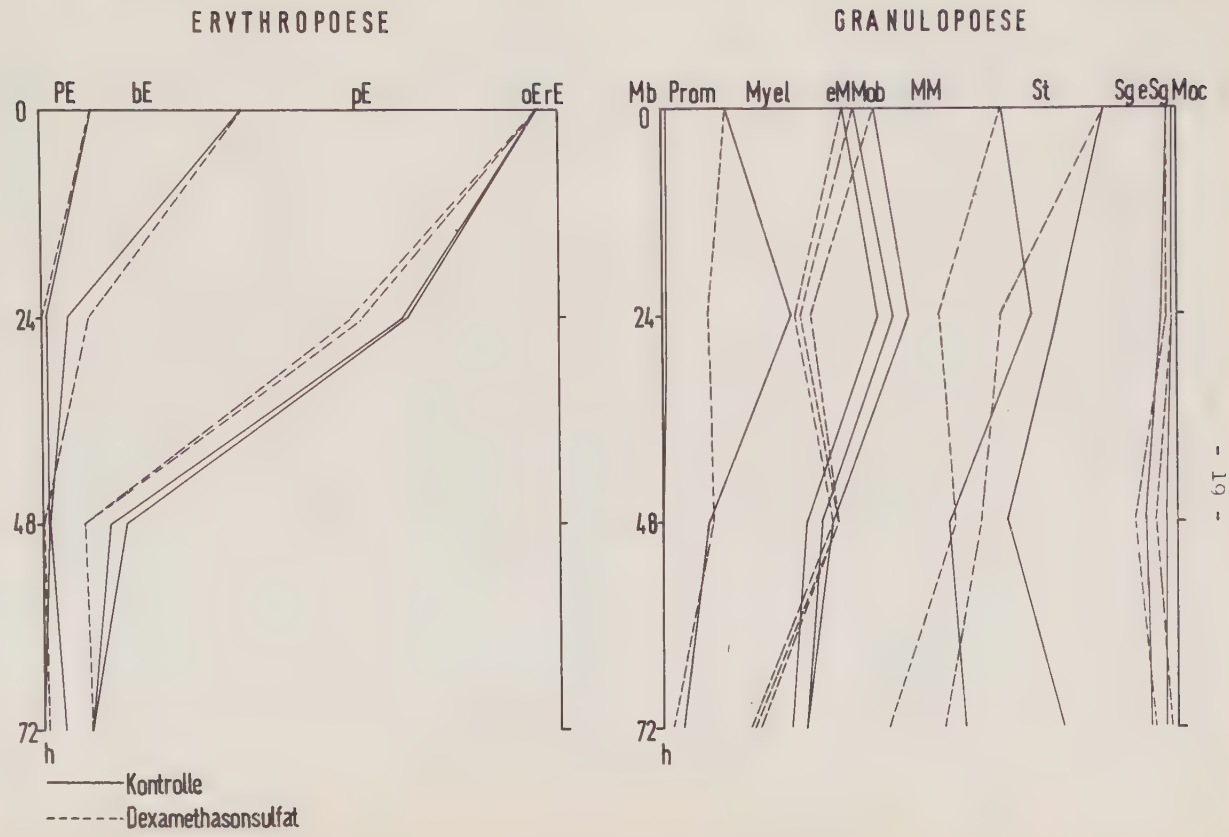


Abb. 2

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 2):

In der 24- und 48-Stunden-Zusatzkultur zeigt sich eine signifikante Linksverschiebung mit Zunahme der reifen Zellen. Erst bei 72 Stunden sind die Kurven nahezu deckungsgleich (Tabelle 4.2).

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 2):

Für die 24- und 72-Stunden-Kultur ergibt sich eine Linksverschiebung der Kurven mit Zusatz, bei 48 Stunden sind die Kurven fast deckungsgleich.

3. G/E-Index (Tabelle 1):

Die G/E-Indices liegen in den Kulturen mit Hormonzusatz an allen drei Kulturtagen höher als in den Kontrollen.

4. Mitoseindices (Tabelle 2, 3):

In der Erythropoese sind nur nach 24 Stunden Mitosen in der Corticosteroid-Zusatzkultur aufgetreten. Nach 48 und 72 Stunden waren keine Mitosen sichtbar (Tabelle 2).

In der Granulopoese ist eine verminderte Mitoseaktivität in den Zusatzkulturen an allen Kulturtagen sichtbar.

Fall II Erythropoese

24^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	3	1	0,49
bE	12	17	3,6
pE	177	100	3,43
oE	4	3	1,14
rE	78	74	3,23
	n_1= 274	n_2= 195	χ^2_4= 11,89

p = 0,017 (signifikant)

48^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
rE	58	47	0,22
Rest	11	4	1,50
	n_1= 69	n_2= 51	χ^2_1= 1,72

p = 0,019 (signifikant)

72^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
pE	10	7	1,01
rE	182	78	
Rest	9	1	2,43
	n_1= 201	n_2= 86	χ^2_2= 3,44

p = 0,18 (nicht signifikant)

Tabelle 4.2

Versuch III: Knochenmark der Patientin I.H., 57 Jahre:

	etwas vermehrte Erythropoese, linksverschobene Granulopoese
Klinische Diagnose:	Rheumatische Polyarthritis, chron. Leberparenchymschaden, chron. Pyelonephritis, latenter Diabetes mellitus.
Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:	Lanicor(R) 2 x 0,25 g Salicell(R) 12 g Binotal(R) Kps. 3 g
Blutbild am Tage der Sternalpunktion:	Hb = 11,5 g %, Erythrocyten = 3,58 Mill/µl Hb_E = 32 pg, L = 6000/µl Eosinophile = 1 %, Stabkernige = 3 % Segmentkernige = 63 %, Lymphocyten = 20 % Monocyten = 13 %
BSG:	85/110 mm n.W.

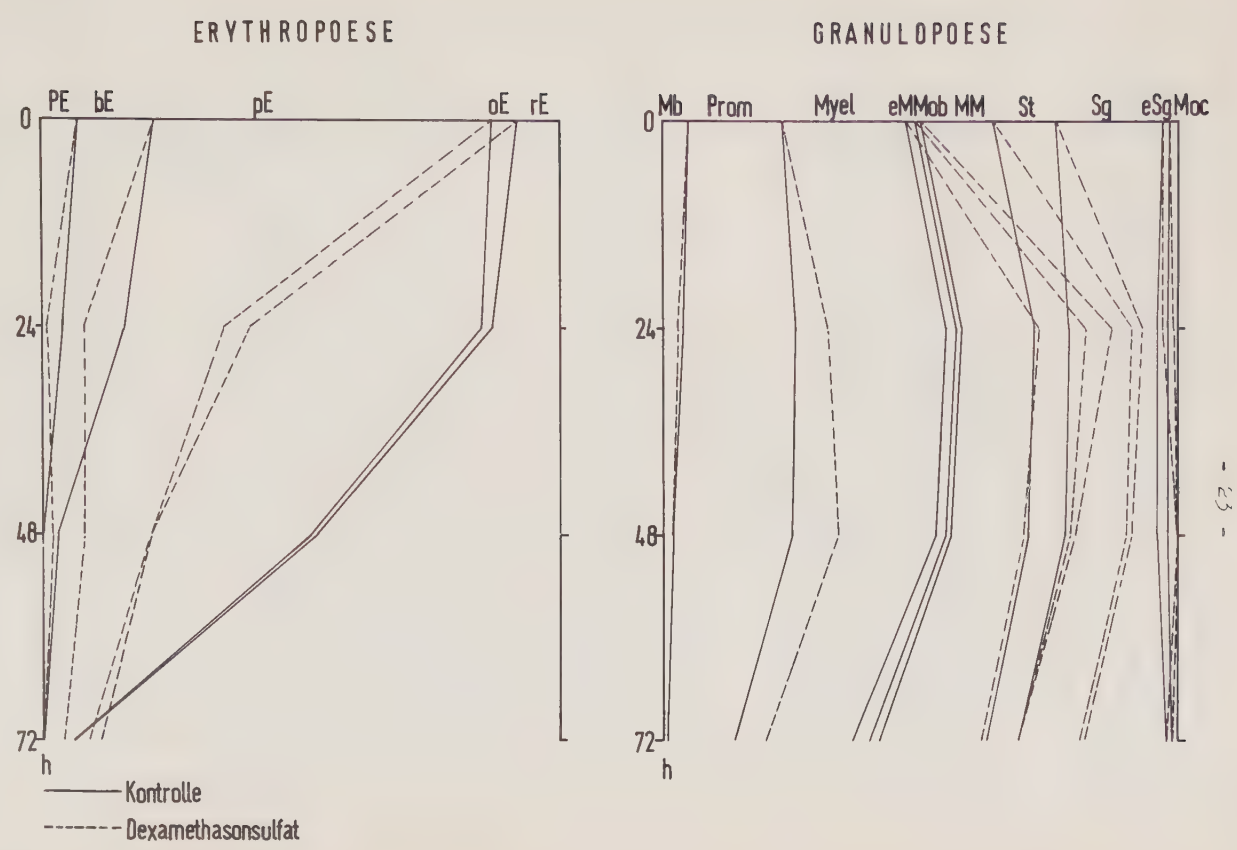

ERYTHROPOESE
PE
bE
pE
oE
rE
0
24
48
72
h
Kontrolle
Dexamethasonsulfat
GRANULOPOESE
Mb
Prom
Myel
eMMob
MM
St
Sg
eSg
Moc
0
24
48
72
h

Abb. 3

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 3):

Die Reifungskurve der roten Reihe zeigt nach 24 und 48 Stunden im Dexamethasonsulfat-Präparat eine signifikante Linksverschiebung mit Zunahme der reifen Zellen. Nach 72 Stunden sind die Kurven nahezu deckungsgleich (Tabelle 4.3).

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 3):

Die Reifungskurve des Zusatzpräparates zeigt nach 24 Stunden eine Rechtsverschiebung. Die Zahl der unreifen Zellen ist vermehrt (besonders Myelocyten). In der 48- und 72-Stunden-Kultur sind die Kurven, abgesehen von der rechtsverschobenen der Promyelocyten, fast deckungsgleich.

3. G/E-Index (Tabelle 1):

Der G/E-Index liegt in der Hormonkultur nach 24 Stunden niedriger als in der Kontrolle. Nach 48 und 72 Stunden findet man in den Zusatzpräparaten einen erhöhten G/E-Index im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollindices.

4. Mitoseindices (Tabelle 2, 3):

In der Erythropoese sind an den beiden ersten Kulturtagen in den Zusatzkulturen mehr Mitosen als in den Kontrollen aufgetreten. Am dritten Kulturtag waren keine Mitosen sichtbar.

In der Granulopoese ist die Mitoserate in der Zusatzkultur an allen Kulturtagen höher als die entsprechenden Kontrollwerte.

Fall III Erythropoese

24^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	21	11	10,32
bE	67	65	7,3
pE	405	242	147,27
oE	10	43	8,91
rE	77	537	181,68
	n_1= 580	n_2= 898	χ^2_4= 355,48

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

48^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	2	5	3,6
bE	14	17	5,02
pE	251	38	61,48
oE	5		2,95
rE	265	232	28,56
	n_1= 537	n_2= 292	χ^2_4= 101,61

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

72^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
bE		2	4,44
pE	5	3	0,06
oE		1	1,18
rE	81	51	0,08
	n_1= 86	n_2= 57	χ^2_3= 5,76

p = 0,12 (nicht signifikant)

Tabelle 4.3

Versuch IV: Knochenmark der Patientin G.H., 66 Jahre:
bei Polycythaemia vera

Klinische Diagnose:	Rudimentärer Vorderwandinfarkt bei unbehandelter Polycythaemia vera.
Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:	Valium$^{(R)}$ 5 mg
Blutbild am Tage der Sternalpunktion:	Hämatokrit = 65 %, Hb = 18,8 %, Erythrocyten = 7,18 Mill/µl Leukocyten = 11 900/µl Thrombocyten = 480 000/µl Eosinophile = 1 %, Stabkernige = 9 % Segmentkernige = 76 %, Lymphocyten = 10 % Monocyten = 4 %

Fall 4: G.H.

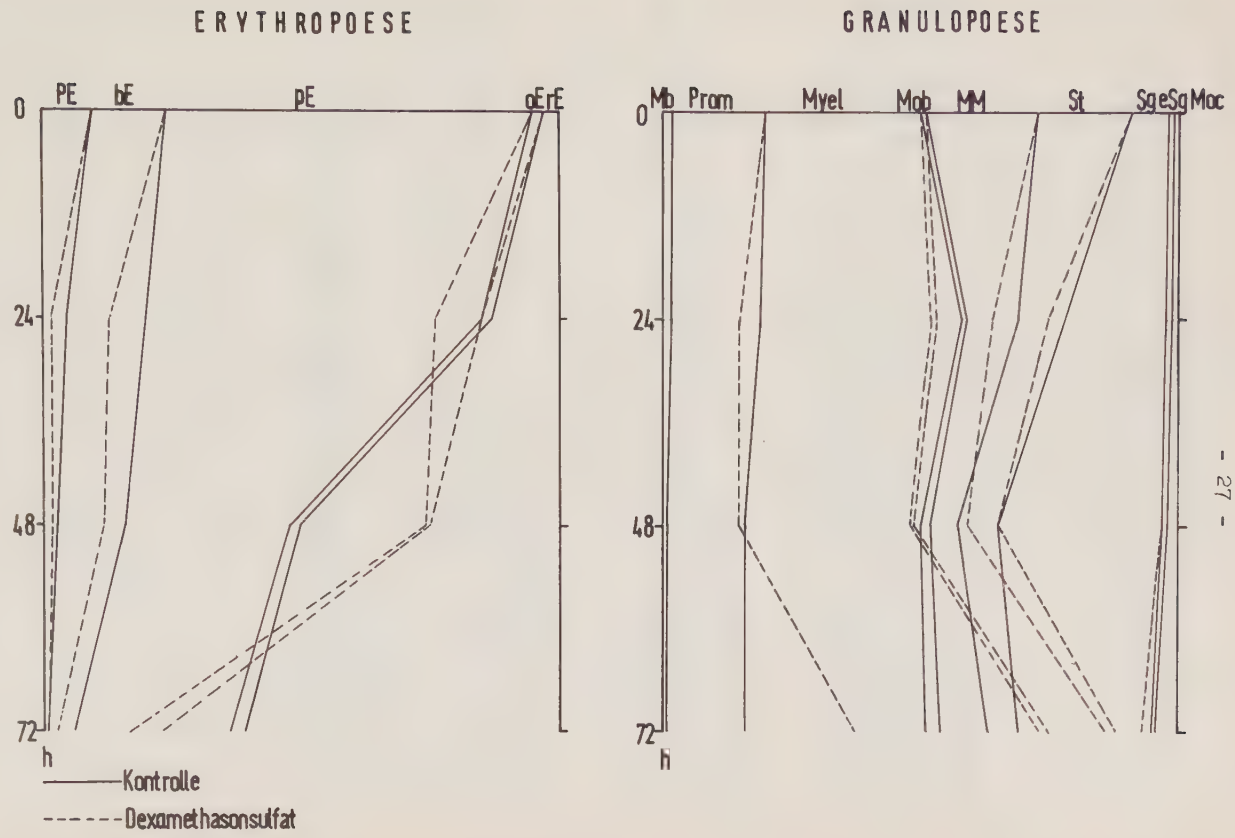


Abb. 4

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 4):

Nach 24 und 72 Stunden Bebrütungszeit ergibt sich eine signifikante Linksverschiebung der Kurven mit Zusatz, nach 48 Stunden eine Rechtsverschiebung (Tabelle 4.4).

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 4):

Für die 24-Stunden-Zusatzkultur ergibt sich eine leichte Linksverschiebung der Kurven, bei 48 Stunden sind sie nahezu deckungsgleich mit denen der Kontrollen. In der 72-Stunden-Zusatzkultur kommt es zu einer Rechtsverschiebung.

3. G/E-Index (Tabelle 1):

Die G/E-Indices der Hormonpräparate nach 48 und 72 Stunden liegen etwa so hoch wie die der Kontrollen, nur der 24-Stunden-Wert liegt höher.

4. Mitoseindices (Tabelle 2, 3):

Der Mitoseindex der Erythropoese steigt unter Dexamethasonsulfat-Zusatz an (24 Stunden), fällt dagegen nach 48 Stunden wieder ab. Nach 72 Stunden steigt er wieder über den Wert des Kontrollpräparates.

Der granulocytopoetische Mitoseindex dagegen liegt in den Zusatzpräparaten außer bei 24 Stunden eindeutig höher.

Fall IV Erythropoese

24^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
pE	322	266	0,36
oE	11	37	19,22
rE	62	65	1,14
Rest	95	57	4,87
	n_1= 490	n_2= 425	χ^2_3= 25,59

$p = 0{,}5 \cdot 10^{-5}$ (signifikant)

48^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
rE	179	138	40,27
Rest	175	414	21,68
	n_1= 354	n_2= 552	χ^2_1= 61,95

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

72^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
pE	66	25	10,90
oE	6	11	3,13
rE	133	135	3,59
Rest	12	4	2,54
	n_1= 217	n_2= 175	χ^2_3= 20,16

$p = 8 \cdot 10^{-5}$ (signifikant)

Tabelle 4.4

Versuch V: Knochenmark der Patientin M.W., 81 Jahre:
verminderte Erythropoese

Klinische Diagnose:	1) Apoplektischer Insult mit Hemiparese links bei dekompensierten Hypertonus. 2) Linksherzinsuffizienz mit Stauungsbronchopneumonie bei Schwielenherz. 3) Niereninsuffizienz mit nephrogener Anaemie. 4) Diabetes mellitus
Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:	Hydergin(R) 3 x 15 Tr. Pepsaletten(R) 3 x 1 Tbl. Catapresan(R) 0,225-0,075-0,075 mg/die Furadantin retard(R) 1 x 1 Kaps. 2 x wöchentl. 1 Tbl. Lasix(R) Valium(R) 5 mg
Blutbild am Tage der Sternalpunktion:	Hb = 9,9 g %, Erythrocyten = 3,15 Mill/µl Hb_E= 31,5 pg, Fe im Serum = 64 gamma-% Leukocyten = 4700/µl Basophile = 1 %, Eosinophile = 7 % Stabkernige = 3 %, Segmentkernige = 58 % Lymphocyten = 28 %, Monocyten = 3 %

BSG: 25/66 mm n.W.

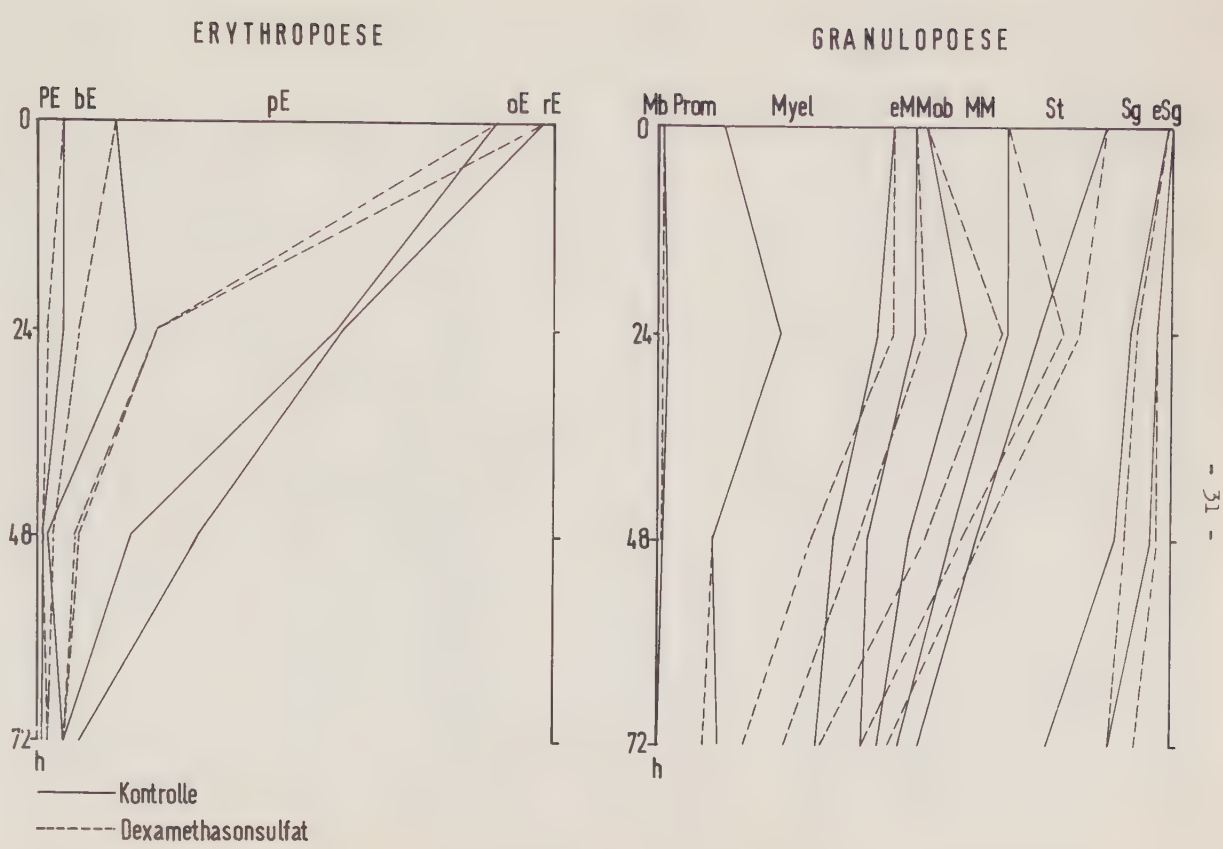

ERYTHROPOESE
PE bE
pE
oE rE
0
24
48
72
h
Kontrolle
Dexamethasonsulfat
GRANULOPOESE
Mb Prom
Myel
eMMab MM
St
Sg eSg
0
24
48
72
h

Abb. 5

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 5):

Für die 24- und 48-Stunden-Kulturen ergeben sich signifikante Unterschiede im Sinne einer Linksverschiebung der Kurven mit Hormonzusatz von denen der Kontrollen, also eine Zunahme reifer Zellen, die bis 72 Stunden noch anhält (Tabelle 4.5).

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 5):

Für die 24-Stunden-Kultur ergibt sich eine Rechtsverschiebung, in der 48-Stunden-Kultur ist dagegen keine Beeinflussung des Zusatzes festzustellen. In der 72-Stunden-Kultur zeigt sich eine Linksverschiebung.

3. G/E-Index (Tabelle 1):

Die G/E-Indices liegen in den Kulturen mit Corticosteroidzusatz zu allen Zeitpunkten deutlich niedriger als in den Vergleichspräparaten.

4. Mitoseindices (Tabelle 2, 3):

In der Erythropoese ist nach 24 Stunden der Mitoseindex in der Zusatzkultur erhöht. Nach 48 und 72 Stunden waren mit und ohne Zusatz keine Mitosen sichtbar.

In der Granulopoese ist eine vermehrte Mitoseaktivität in den Hormonkulturen bei 48 und 72 Stunden sichtbar.

Fall V Erythropoese

24^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	13	9	7,53
bE	34	31	14,08
pE	95	81	41,48
oE	3		
rE	98	412	34,57
	n_1= 243	n_2= 533	χ^2_3= 97,66

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

48^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	3	4	0,45
bE	3	8	0,34
pE	33	15	27,44
oE	27	6	38,21
rE	140	396	9,83
	n_1= 206	n_2= 429	χ^2_4= 76,27

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

72^h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	$(B-E)^2/E$
pE	3	7	0,41
oE	2	1	3,21
rE	68	256	0,07
Rest	1	5	0,19
	n_1= 74	n_2= 269	χ^2_3= 3,88

$p > 0,1$ (nicht signifikant)

Tabelle 4.5

MITTELWERTSKURVE (M.D. MW. GH. IH. FB.)

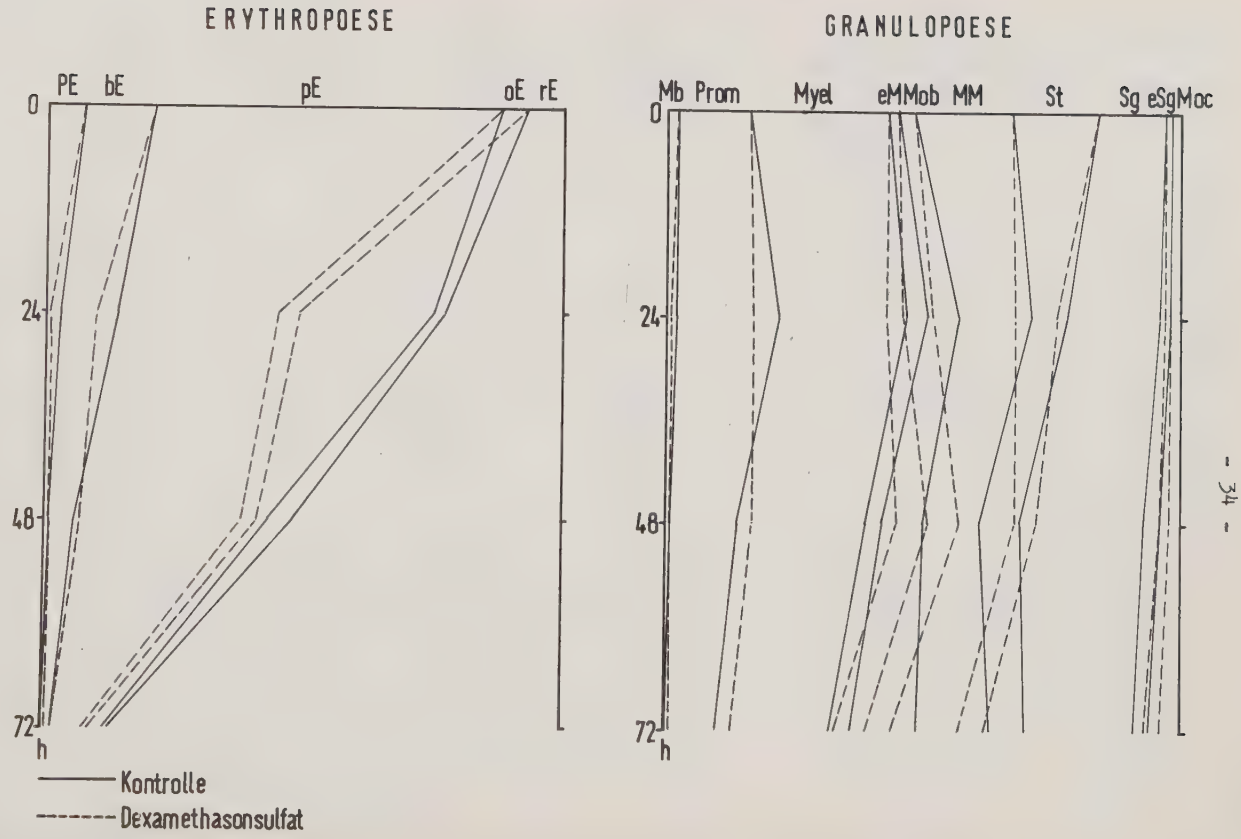


Abb. 6

Zusammenfassung der Versuche I - V

Abb. 6: Mittelwertskurve

1. Reifungskurve der Erythropoese:

Es ergibt sich besonders bei der 24-Stunden-Zusatzkultur eine Linksverschiebung, die bei der 48- und 72-Stunden-Kultur schwächer ist.

2. Reifungskurve der Granulopoese:

Die Reifungskurven (Kontroll- und Zusatzkurven) sind nahezu deckungsgleich.

3. G/E-Index (Mittelwerte Tabelle 1):

Alle Mittelwerte der G/E-Indices der Zusatzkulturen liegen nach 24, 48 und 72 Stunden etwas höher als die der Kontrollen.

4. Mitoseindices (Mittelwerte Tabelle 2, 3):

In der Erythropoese fallen die Mittelwerte der Mitoseindices von 0 bis 72 Stunden kontinuierlich ab. Auch bei den Kulturen mit Hormonzusatz ist dies der Fall. Hier liegen aber die Indices alle höher als die entsprechenden Kontrollwerte.

In der Granulopoese liegen die Mitoseindices der Zusatzkulturen außer bei 24 Stunden jeweils höher als in den Kontrollen.

In den Tabellen 5 - 7 sind die Zellarten prozentual auf alle differenzierten Knochenmarkzellen aufgetragen:

Abb. 7 und 8:
Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Prozentualer Anteil der Retikulumzellen (Abb. 7) und Lymphocyten (Abb. 8)

	Kontrollen				Zusatz		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	0,8	0,6	0,5	0,3	2,3	2	5,1
II	5,8	2	1,4	2,6	3,5	1,6	1,4
III	0,8	0,5	0,3	0,4	1,2	1,9	0,5
IV	3,5	0,5	2	2,5	1,5	1,9	0,7
V	0,9	0,8	1,7	1,8	1,8	1,3	4,1
Summe	11,8	4,4	5,9	7,6	10,3	8,7	11,8
Mittelwert	2,4	0,9	1,2	1,5	2,1	1,7	2,4

Tabelle 5: Anzahl der großen Retikulumzellen in %

	Kontrollen				Zusatz		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	0,9	0,5	0,5	0,5	0,7	0,9	0,9
II	3,4	0,4	0,7	2,6	1,3	0,2	1,8
III	0,9	0,6	0,2	0,1	0,4	1,0	0,8
IV	2,4	0,5	0,3	1,3	1,4	1,0	1,9
V	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5	0,3	0,8
Summe	7,9	2,4	2,0	4,9	4,3	3,4	6,2
Mittelwert	1,6	0,5	0,4	1,0	0,9	0,7	1,2

Tabelle 6: Anzahl der kleinen Retikulumzellen in %

	Kontrollen				Zusatz		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	6,4	6,0	8,6	9,9	7,1	5,9	13,6
II	3,7	12,7	8,6	10,7	10,0	20,4	7,6
III	6,6	5,7	7,4	9,6	4,0	14,8	15,1
IV	5,1	5,7	5,8	5,9	4,3	6,0	6,8
V	6,1	10,1	10,4	15,4	7,0	9,4	11,9
Summe	27,9	40,2	40,8	51,5	32,4	56,5	55,0
Mittelwert	5,6	8,0	8,2	10,3	6,5	11,3	11,0

Tabelle 7: Anzahl der Lymphocyten in %

Abb. 7

MITTELWERTE DER RETIKULUMZELLEN

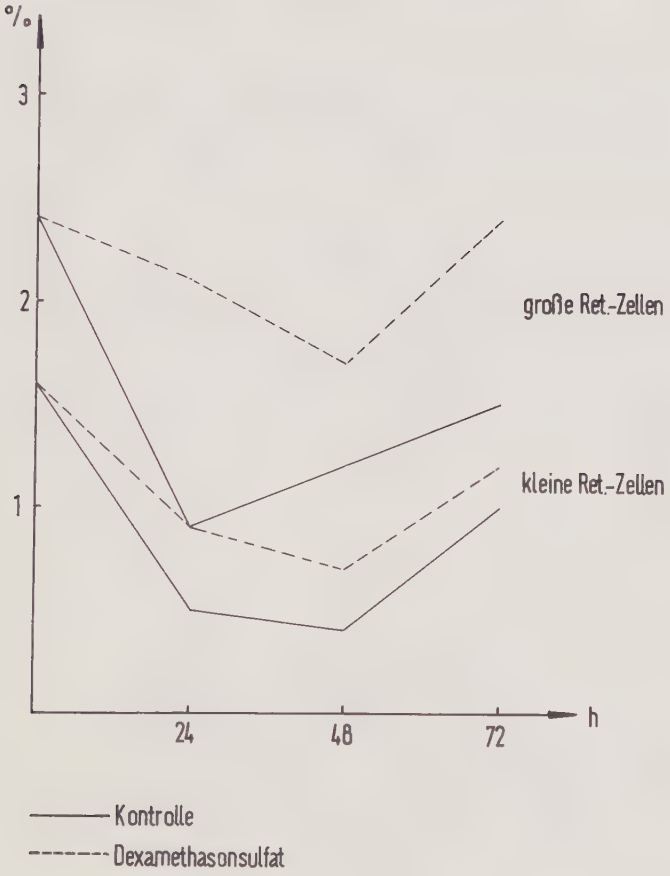
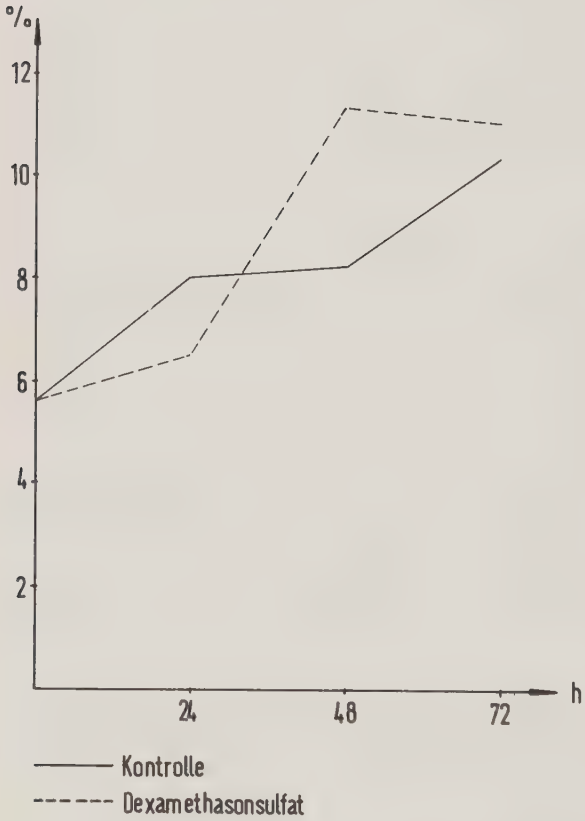


Abb. 8

MITTELWERTE DER LYMPHOCYTEN



Um auch den Einfluß des Dexamethasonsulfats auf die retikulären Zellen sowie auf die Lymphocyten zu erfahren, vergleichen wir die Mittelwerte der Kontrollpräparate mit denen der Zusatzausstriche. Die großen Retikulumzellen vermehren sich von 24 über 48 bis 72 Stunden kontinuierlich. Die Mittelwerte der Zusatzpräparate liegen jedoch jeweils höher als bei den Kontrollen. Der Anstieg in den Zusatzversuchen ist an allen Kulturtagen signifikant (Tabelle 5; 8.1; 8.2; und Abb. 7).

Bei den kleinen Retikulumzellen verhält es sich ähnlich. Bei 24 und 48 Stunden liegen die Mittelwerte der Zusatzpräparate signifikant höher als bei den Kontrollen. Nach 72 Stunden ist der Zusatzwert etwas größer als der Kontrollwert (Tabelle 5; 9.1; 9.2 und Abb. 7).

Eine eindeutige Aussage über den Einfluß des Dexamethasonsulfats auf die Lymphocyten ist nicht zu machen. Zwar steigt die Lymphocytenzahl prozentual von 0 bis 72 Stunden an, doch ist sie bei 24 Stunden mit Zusatz signifikant vermindert, bei 48 Stunden signifikant vermehrt und bei 72 Stunden fast der Kontrolle angeglichen (Tabelle 6; 10 und Abb. 8).

χ^2-Test für die großen Retikulumzellen

24^h

Fall	Kontrolle		Zusatz	
I	13	2 081	46	2 007
II	40	2 007	72	2 035
III	10	2 109	24	2 019
IV	10	2 000	30	2 003
V	16	2 017	37	2 008
	B_{GR}= 89	B_{GR+Z}= 10 214	B_{GR}= 209	B_{GR+Z}= 10 072

	B_{GR}	B_Z	B_{GR+Z}	E_{GR}	E_Z
Ko	89	10 125	10 214	150	10 064
Zu	209	9 863	10 072	148	9 924
Su	298		20 286		

B_{GR}= Beobachtungswert 'große Retikulumzellen'

B_{GR+Z}= Beobachtungswert 'große Retikulumzellen' + Zellzahl

E_{GR}= Erwartungswert 'große Retikulumzellen'

E_{GR}= $\frac{\text{Summe der 'großen Retikulumzellen'}}{\text{Summe der Gesamtzellzahl}}$ multipliziert mit B_{GR+Z}

B_Z= Beobachtungswert Zellzahl

E_Z= Erwartungswert Zellzahl

E_Z= $B_{GR+Z} - E_{GR}$

Tabelle 8.1 (siehe Fortsetzung S. 41)

Ko: $E_{GR} = \frac{298 \cdot 10\,214}{20\,286} = 150{,}04 \approx 150$

Zu: $E_{GR} = \frac{298 \cdot 10\,072}{20\,286} = 147{,}96 \approx 148$

Ko: $E_Z = 10\,214 - 150 = 10\,064$

Zu: $E_Z = 10\,072 - 148 = 9\,924$

Ko: $B_{GR} - E_{GR} = 89 - 150 = -61 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{61^2}{150} = 24{,}81$

$B_Z - E_Z = 10\,125 - 10\,064 = 61 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{61^2}{10\,064} = 0{,}37$

Zu: $B_{GR} - E_{GR} = 209 - 148 = 61 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{61^2}{148} = 25{,}14$

$B_Z - B_Z = 9\,863 - 9\,924 = -61 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{61^2}{9\,924} = 0{,}37$

$\chi_1^2 = 50{,}69$

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

Tabelle 8.1

48^h

	B_{GR}	B_Z	B_{GR+Z}	E_{GR}	E_Z
Ko	93	8 332	8 425	122,14	8 302,86
Zu	159	8 799	8 958	129,86	8 828,14
Su	252		17 383		

$$\chi_1^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = 13,69$$

$p = 2 \cdot 10^{-4}$ (signifikant)

72^h

	B_{GR}	B_Z	B_{GR+Z}	E_{GR}	E_Z
Ko	62	4 177	4 239	92	4 147
Zu	136	4 738	4 874	106	4 768
Su	198		9 113		

$$\chi_1^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = 18,68$$

$p = 1,5 \cdot 10^{-5}$ (signifikant)

Tabelle 8.2

χ^2-Test für die kleinen Retikulumzellen

24^h

Fall	Kontrolle		Zusatz	
I	11	2 081	14	2 007
II	8	2 007	26	2 035
III	13	2 109	8	2 019
IV	9	2 000	28	2 003
V	9	2 017	11	2 008
	B_{KR}= 50	B_{KR+Z}= 10 214	B_{KR}= 87	B_{KR}+Z= 10 072

	B_{KR}	B_Z	B_{KR+Z}	E_{KR}	E_Z
Ko	50	10 164	10 214	69	10 145
Zu	87	985	10 072	68	10 004
Su	137		20 286		

B_{KR} = Beobachtungswert 'kleine Retikulumzellen'

B_{KR+Z} = Beobachtungswert 'kleine Retikulumzellen' + Zellzahl

Tabelle 9.1 (siehe Fortsetzung S. 44)

Ko: $E_{KR} = \frac{137 \cdot 10\,214}{20\,286} = \underline{68{,}98} \approx 69$

Zu: $E_{KR} = \frac{137 \cdot 10\,072}{20\,286} = \underline{68{,}02} \approx 68$

Ko: $E_Z = 10\,214 - 69 = 10\,145$

Zu: $E_Z = 10\,072 - 68 = 10\,004$

Ko: $B_{KR} - E_{KR} = 50 - 69 = -19 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{19^2}{69} = 5{,}23$

$B_Z - E_Z = 10\,164 - 10\,145 = +19 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{19^2}{10\,145} = 0{,}04$

Zu: $B_{KR} - E_{KR} = 87 - 68 = +19 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{19^2}{68} = 5{,}31$

$B_Z - E_Z = 985 - 10\,004 = -19 \quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{19^2}{10\,004} = \underline{0{,}04}$

$\chi_1^2 = 10{,}62$

$p = 0{,}0012 = 1{,}2 \cdot 10^{-3}$ (signifikant)

Tabelle 9.1

48^h

	B_{KR}	B_Z	B_{KR+Z}	E_{KR}	E_Z
Ko	31	8 394	8 425	48,5	8 376,5
Zu	69	8 889	8 958	51,5	8 906,5
Su	100		17 383		

$$\chi_1^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = 12{,}33$$

$p = 4{,}5 \cdot 10^{-4}$ (signifikant)

72^h

	B_{KR}	B_Z	B_{KR+Z}	E_{KR}	E_Z
Ko	41	4 198	4 239	44,2	4 194,8
Zu	54	4 820	4 874	50,8	4 823,2
Su	95		9 113		

$$\chi_1^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = 0{,}43$$

$p > 0{,}1$ (nicht signifikant)

Tabelle 9.2

χ^2-Test für Lymphocyten

24^h

B_L = Beobachtungswert 'Lymphocyten'

	B_L	B_Z	B_{L+Z}	E_L	E_Z
Ko	818	9 396	10 214	741,15	10 472,85
Zu	654	9 418	10 072	730,85	9 341,15
Su	1 472		20 286		

$\chi^2_1 = 17{,}24$

$p = 3 \cdot 10^{-5}$ (signifikant)

48^h

	B_L	B_Z	B_{L+Z}	E_L	E_Z
Ko	596	7 829	8 425	730	7 695
Zu	910	8 048	8 958	776	8 182
Su	1 506		17 383		

$\chi^2_1 = 52{,}26$

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

72^h

	B_L	B_Z	B_{L+Z}	E_L	E_Z
Ko	437	3 802	4 239	458,65	3 780,35
Zu	549	4 325	4 874	527,35	4 346,65
Su	986		9 113		

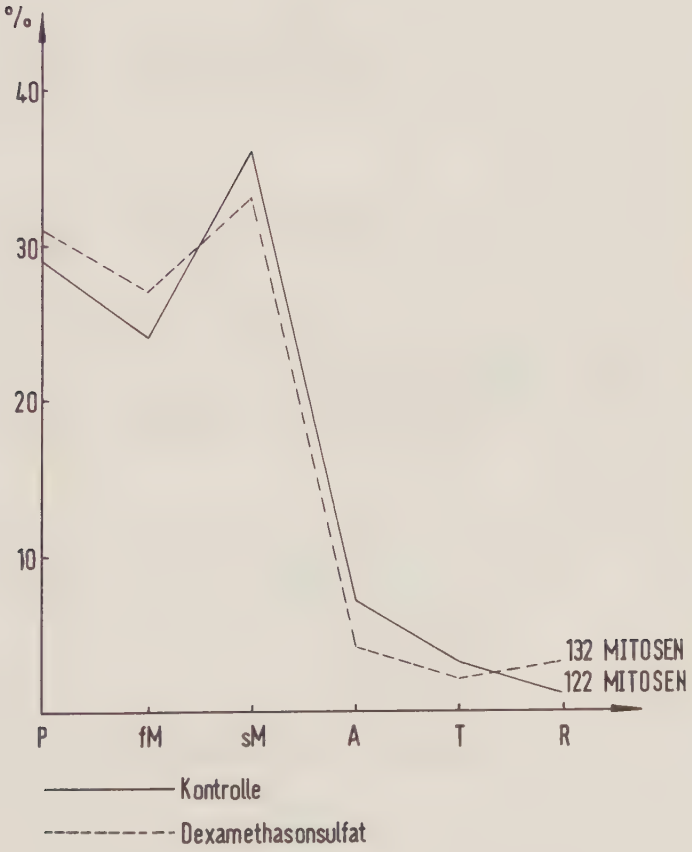
$\chi^2_1 = 2{,}14$

$p > 0{,}1$ (nicht signifikant)

Tabelle 10

Abb.9

KARYOLOGISCHE KURVE (Weiße Reihe)



Die karyologischen Kurven

Hierbei werden die Mitosen aller Fälle verwertet, mit Ausnahme der Originalpräparate, da es hierfür keine vergleichbaren Präparate gibt.

1. Erythropoese:

   Wegen der zu kleinen Mitosezahl (insgesamt 71 Mitosen) haben wir auf eine Darstellung der karyologischen Kurve verzichtet.

2. Granulopoese:

   Insgesamt werden 254 Mitosen gezählt, wobei auf die Kontrollpräparate 122 und auf die Zusatzpräparate 132 entfielen.

   Die Kontroll- und Zusatzkurve gleicht in ihrem Verlauf den karyologischen Durchschnittskurven, nur daß die Anzahl der Prophasen etwas hoch erscheint. Sonst ergibt sich ein fast deckungsgleiches Mitosespektrum (Abb. 9).

   Abb. 9:
   Abszisse: Die verschiedenen Mitosephasen
   fM = frühe Metaphase
   sM = späte Metaphase
   A = Anaphase
   T = Telophase
   R = Rekonstruktionsphase

   Ordinate: Prozentualer Anteil an den Mitosephasen

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Reifungskurven der Erythropoese (Abb. 1 - 6, Tab. 4.1 - 4.5)

Durch Zusatz von 0,25 µg/ml Dexamethasonsulfat auf menschliches Knochenmark ergibt sich im Vergleich zu den Kontrollkulturen besonders bei den 24- und 48-Stunden-Kulturen eine signifikante Linksverschiebung, die bis 72 Stunden nachläßt. Lediglich in einem Fall (IV) ist in der 48-Stunden-Kultur eine Rechtsverschiebung zu erkennen. Es ergibt sich also durch den Zusatz eine signifikante Reifungsförderung der Erythropoese durch Dexamethasonsulfat.

2. Reifungskurven der Granulopoese (Abb. 1 - 6)

Der Einfluß des Dexamethasonsulfat auf die Granulopoese ist an allen Kulturtagen gering (Abb. 6) und uneinheitlich. Bis auf den 5. Versuch überwiegt die Reifungshemmung: Im 1., 2. und 4. Versuch fehlt die Vermehrung der teilungsfähigen Zellen am 1. Tag und in allen 4 Versuchen sind nach 48 bzw. 72 Stunden weniger Segmentkernige und Stabkernige als in den Kontrollen.

3. G/E-Indices (Tab. 1)

Die Mittelwerte der G/E-Indices sind in den Zusatzpräparaten gegenüber den Kontrollen leicht erhöht.

4. Mitoseindices (Tab. 2 und 3)

Durch Vergleich der Mitoseindices der Kontrollkulturen und der Zusatzkulturen läßt sich die Regenerationsleistung des Knochenmarkes prüfen.
Im Durchschnitt sind die Mitoseindices der Zusatzkulturen in der Erythropoese sowie in der Granulopoese ab 48 h größer als bei den Kontrollen. Die Mittelwerte der behandelten Kulturen bestätigen diese Feststellung. Das Dexamethasonsulfat scheint nicht nur die Reifung der Erythropoese zu fördern, sondern auch die Regeneration sowohl der Erythropoese als auch der Granulopoese. Diese Unterschiede wurden nicht signifikant.

5. Karyologische Kurve (Abb. 9)

Die karyologischen Kurven (Zusatz- und Kontrollkurve) der Granulopoese (die der Erythropoese wurden nicht berücksichtigt, da die Mitosezahl zu gering war) zeigen keinen auffälligen Unterschied und gleichen in ihrem Verlauf den karyologischen Durchschnittskurven. Dexamethasonsulfat übt also keinen hemmenden Einfluß im Sinne eines Mitosegiftes auf die Mitosen aus.

6. Retikuläre Gewebe (Tab. 5 und 6, Abb. 7)

Das retikuläre Gewebe erfährt durch Dexamethasonsulfat eine Vermehrung der Zellzahlen. Der Anstieg der 'großen Retikulumzellen' ist an allen Kulturtagen signifikant, der der kleinen bei 24 und 48 Stunden (Tab. 8.1, 8.2, 9.1, 9.2).

7. Lymphopoese (Tab. 7, Abb. 8)

Die Ergebnisse über den Einfluß des Dexamethasonsulfat auf das lymphopoetische System sind sehr uneinheitlich. Bei der 24-Stunden-Zusatzkultur ist die Lymphocytenzahl im Vergleich zu der Kontrollkultur signifikant vermindert (Tab. 10), bei 48 Stunden vermehrt und bei 72 Stunden nur leicht erhöht.

D I S K U S S I O N

In der Literatur sind bisher kaum Arbeiten zu finden, die sich mit der Einwirkung von Corticosteroiden auf das menschliche Knochenmark in vitro beschäftigen. Es liegen zwar schon mehrere Untersuchungsergebnisse über die Proliferationskinetik der Granulo- sowie Erythropoese unter dem Einfluß von Corticosteroiden vor, doch sind diese, besonders im Hinblick auf den Vergleich zwischen in vivo- und in vitro-Untersuchungen, uneinheitlich [6,28,30,11,23,13,14]. Schwer vergleichbar sind die erwähnten Arbeiten außerdem wegen ihrer unterschiedlichen Corticosteroidkonzentrationen (s. Einleitung), und es fehlen systematische Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Corticoiden. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit die gleiche Konzentration von Dexamethasonsulfat wie von anderen Corticosteroiden, nämlich 0,25 µg/ml, zum Medium menschlicher Knochenmarkkulturen zugesetzt [13,14,19,35,40]. In den vergleichenden Untersuchungen mit Prednisolonacetat und Triamcinolon [13,14,41] wurde jeweils eine Proliferationshemmung der Erythropoese sowie der Granulopoese festgestellt. Durch Dexamethasonsulfat ließ sich dagegen kein wachstumshemmender Einfluß auf die Hämatopoese feststellen.

Der Zusatz von 0,25 µg/ml Dexamethasonsulfat zum Kulturmedium bewirkte sogar eine Stimulierung der Proliferation der Erythropoese einschließlich der Vermehrung von retikulären Zellen. Mit zunehmender Kulturdauer traten unter Dexamethasonsulfat gegenüber den Kontrollen in allen fünf Fällen signifikant vermehrt reife Erythroblasten auf (siehe Abb. 1 - 6), wenn auch die G/E-Indices nur wenig erhöht wurden. Auch in der Granulopoese fanden sich unter Dexamethasonsulfat etwas mehr Mitosen als bei den Kontrollen. Die Reifung war aber nur bei der Granulopoese einer renalen Anaemie (Versuch 5) gefördert, in den anderen 4 Versuchen mehr oder weniger gehemmt. Somit wird bei der Granulopoese nur die Regeneration, nicht die Reifung stimuliert.

Da ebenso wie die Reifung die Regeneration der Erythroblasten (Mitoseindices) der durch Dexamethasonsulfat beeinflußten Kulturen verstärkt ist, wird durch Dexamethasonsulfat, wie oben schon erwähnt, die gesamte Proliferation der Erythropoese ge-

fördert. Auch durch 0,25 µg/ml Prednisolonsulfat konnte Schellack [35] an menschlichem Knochenmark in vitro eine Reifungsförderung in der Erythropoese feststellen. In Tierversuchen mit Cortisol-, ACTH- und Dexamethason-Verabreichung wurde ebenfalls eine Proliferationsförderung der Erythropoese beobachtet [9,17,20,30].

Nach klinischen Untersuchungen besitzt Dexamethasonsulfat eine wesentlich stärkere antiproliferative (antiphlogistische und antiallergische) Wirkung als Prednisolonacetat und Triamcinolon. An der Knochenmarkkultur wurde der Effekt, nämlich eine Proliferationshemmung, keineswegs verstärkt. Vielmehr wurde auf die Erythropoese eine einwandfreie Proliferationsförderung ausgeübt obgleich die Wirkdosis am Bindegewebe 7 - 10 mal höher liegt. Da die klinischen Ergebnisse aber nicht mit unseren experimentellen am Knochenmark übereinstimmen, kann eine Beziehung zu der antiinflammatorischen Wirkung, wie sie Ruhmann [34] und Taifour [36] bei der Prüfung des wachstumshemmenden Effektes verschiedener Corticoid-Abkömmlinge auf Mäusefibroblastenkulturen nachwies, nicht bestätigt werden. Hierbei muß auch berücksichtigt werden, daß eine Substanz in vivo eine andere Pharmakokinetik haben kann als in vitro. Dadurch könnten sich Unterschiede in der Wirkungsweise erklären lassen.

Dexamethasonsulfat entsteht durch Veresterung von Dexamethason mit Schwefelsäure. Es wäre denkbar, daß durch den Sulfatsubstituenten die Wirksamkeit des Cortisonderivats verändert wurde. Somit könnte man eine weitere Erklärung dafür finden, warum Dexamethasonsulfat das Wachstum der Erythropoese fördert und nicht hemmt. Dafür sprechen auch die Untersuchungsergebnisse mit 0,25 µg/ml Prednisolonsulfat [35], die eine Reifungsförderung der Erythropoese brachten; denn dieses Cortisonderivat hat wie das Dexamethasonsulfat einen Sulfatsubstituenten. (0,25 µg/ml Prednisolonacetat [13] verursachte dagegen eine Proliferationshemmung der Erythropoese.) In unserer Versuchsreihe nahmen die großen und kleinen Retikulumzellen an allen Kulturtagen zu. In den Untersuchungen mit Triamcinolon und Prednisolonacetat [13,14,41] wurde dagegen eine Verminderung der retikulären Zel-

len festgestellt. Da eine Vielzahl von Forschern [1,26 u.a.] eine Beziehung zwischen den kleinen Retikulumzellen ('Mutterzellen der Blutzellen') und den haemapoetischen Zellen sehen, ist das unterschiedliche Verhalten bei Stimulierung und Hemmung durchaus verständlich.

Die Lymphopoese wurde durch das Cortisonderivat Dexamethasonsulfat gegenüber der Kontrollkultur am ersten Kulturtag gehemmt, am zweiten stimuliert und am dritten Tag nicht beeinflußt. Da die Ergebnisse zu unterschiedlich ausfielen, kann hierzu keine Aussage gemacht werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G D E R A R B E I T

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Proliferation von menschlichen Knochenmarkzellen durch Zugabe von 0,25 µg/ml Dexamethasonsulfat in vitro beeinflußt wird. Wir wiesen nach, daß durch den Zusatz des Corticosteroids zum Kulturmedium eine Förderung der Proliferation der Erythropoese erreicht wird und die retikulären Zellen sich vermehrten. In der Granulopoese wurde nur die Regeneration gefördert.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

L I T E R A T U R

[1] ALBRECHT, M., v. RIESEN, I.:
Einführung in die Zelldiagnostik des menschlichen Knochenmarkes und Blutes.
(Walter de Gruyter, Berlin 1957)

[2] BASERGA, A., MORSIANI, M.:
Regeneration des lymphatischen Gewebes nach Prednisolon.
Schweiz. med. Wschr. 91, 1190 (1961)

[3] BELITZ, H.-J.:
Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
Sonderdruck 'Der Methamatikunterricht', Heft 3/60
(Klett, Stuttgart 1960)

[4] BODLEYSCOTT, R.:
The treatment of acute leukaemia
Brit. Med. J. ii, 75 (1955)

[5] BOLL, I.:
Granulopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
(Springer Verlag, Heidelberg 1966)

[6] BOLL, I., MERSCH, G., SCHOEN, S., GÖTTKE, U., BOXHEIMER, D., LUCKE, G.:
Hormoneinwirkung auf die Proliferationskinetik humaner Knochenmarkkulturen.
Klin. Wschr. 46, 610 (1968)

[7] BOLL, I., MERSCH, G.:
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulozytopoese in vitro.
Blut 19, 11 (1969)

[8] BOLL, I.:
Leitfaden der cytologischen Knochenmark-Diagnostik
Band 11 der Reihe 'Hämatologie und Bluttransfusion'
(J.F. Lehmanns Verlag München 1972)

[9] BOZZINI, C.E., ALIPPI, R.M.:
Erythropoeitin like activity of dexamethasone on the time course of radioiron incorporation into red blood cells of erythremic mice.
Acta Physiol. Lat.-Amer. 21:21 (1971) Ref. Exc. Med. 6.8, Nr. 2810 (1972)

[10] BULLOUGH, W.S.:
The energy relation of mitotic activity.
Biol. Rev. 27, 133 (1952)

[11] CARDINALI, G., De CARO, B.M., HANDLER, A.H., ABOUL-ENEIN, M.:
Effect of high doses of cortisone on bone marrow cell proliferation in the Syrian hamster.
Cancer Res. 24, 969 (1964)

[12] CAVALLI-SFORZA, L.:
Biometrie
(Fischer, Stuttgart 1969)

[13] CHRISTOPH, U.:
Die Einwirkung von Prednisolonacetat auf menschliches Knochenmark in vitro (ausgewertet im Giemsa-Präparat und mit alkalischer Leukocytenphosphatase)
Diss. (Berlin 1972)

[14] CHRISTOPH, B.:
Die Einwirkung von Triamcinolon auf menschliches Knochenmark in vitro (ausgewertet im Giemsa-Präparat und mit alkalischer Leukocytenphosphatase)
Diss. (Berlin 1972)

[15] ELVES, M.W., GOUGH, J., ISRAELS, M.C.G.:
The place of the lymphocyte in the reticuloendothelial system: A study of the in vitro effect of prednisolone on lymphocytes.
Acta haemat. (Basel) 32, 100 (1964)

[16] FARNES, P., BARKER, B.E.:
Effect of Prednisolone on human bone marrow cultures.
Metabolism 14, 1 (1965)

[17] FRUHMANN, G.J., GORDON, A.:
Effects of growth hormone and cortisol upon haemopoiesis.
Acta haemat. 15, 249 (1956)

[18] GILETTE, R., BUCHSBAUM, R.:
Some effects of desoxycorticosterone glycoside on chick fibroblasts in vitro.
from the department of biologica sciences, University of Pittsburg, Pa P.S.E.B.M. V83, April 8 (1953)

[19] GLÖCKLER, C.:
Die Einwirkung von Corticosteron und Hydrocortison auf menschliches Knochenmark.
Diss., Berlin (in Vorbereitung)

[20] HALVORSEN, S.:
Effects of ACTH on erythropoesis in the rabbit.
Acta physiol. scand. 58, 30 (1963)

[21] HENCH, D.S., KENDALL, E.C., SLOCUMB, C.H., POLLY, H.F.:
The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis.
Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 24, 181 (1949)

[22] HITZENBERGER, G., KURKA, P.:
Die Wirkung von 9-α-Fluor-16-α-Methylprednisolon-21-Na-Hemisulfat (Dexa-Scheroson) auf die weißen Blutzellen und seine Verwendung in der inneren Klinik und in der Anästhesiologie.
Wiener klin. Wschr. 7, 4 (1963)

[23] HUNSTEIN, W., STREY, M.:
Zur Wirkung von Prednisolon auf die H_3-Thymidin-Einbaurate in Knochenmarkzellen von Ratten.
Klin. Wschr. 43, 52 (1965)

[24] KAISER, H.:
Cortisonderivate in Klinik und Praxis
(Thieme, Stuttgart 1965) 4. Auflage

[25] MACIEIRA, C.A.:
Action of cortisone on human fibroblasts in vitro.
Experientia 22, 390 (1961)

[26] MASSHOFF, W.:
Über Reaktionen des lymphatischen Gewebes.
Med. Welt 26, 1393 (1960)

[27] MORRISON, J.H., TOEPFER, J.R.:
Cellular changes in the bone marrow following chronic treatment of rats with cortisol.
Acta haemat. 38, 250 (1967)

[28] MÜLLER, D.:
Die Wirkung von Prednisolon auf das gesunde menschliche Knochenmark und auf Leukaemiezellen.
10. Europ. Haematolog. Kongr., Straßburg 1965

[29] OKUDA, R., MARIMO, Y., KANAYA, K., YAMAMOTO, Y., WADA, O.:
Ann. Paediat. Japon 4, 96 (1960)

[30] PESCHLE, C., CONDORELLI, M.:
Studies on the effects of hormones on erythropoiesis in mice.
13. Intern. Hämat. Kongr. München 1970, Ste 11

[31] RAPPAY, G., FAZEKAS, I., GYÉVAI, A.:
Effect of hydrocortisone on growth in vitro of fibroblast-like (Fl) cells derived from rat organs.
Acta Med. Acad. Sci. Hung. 25, 451 (1968)

[32] RASCHE, B., ULMER, W.T.:
Glucocorticoideinwirkung auf Wachstum und Stoffwechsel permanenter Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionsdauer.
Z. Zellforschung 84, 506 (1968)

[33] ROZEN, V.B., CHERMIN, L.S.:
The effect of various glucocorticoid doses on the growth of single-layer connective tissue cultures.
Patol. Fiziol. Eksp. Terapiya 8, 59 (1964)

[34] RUHMANN, G., BERLINER, D.L.:
Effects of steroids on growth of mouse fibroblasts in vitro.
Endocrinol. 76, 916 (1965)

[35] SCHELLACK, A.:
Die Einwirkung von Prednisolonsulfat auf menschliches Knochenmark in vitro.
Diss., Berlin (in Vorbereitung)

[36] TAIFOUR, A.-H.:
Autoradiographische Untersuchungen an Glucocorticoid-vorbehandelten Mäusefibroblasten-Kulturen.
Diss. (Mannheim 1968)

[37] TAUSK, M.:
Pharmakologie der Hormone.
(Thieme, Stuttgart 1970)

[38] TORNEY, D.C., FUDENBERG, H.H., KAMIN, R.M.:
Effect of prednisolone on synthesis of DNA and RNA by human lymphocytes in vitro.
Nature (Lond.) 213, 281 (1967)

[39] UNDRICOV, M.J., ROZEN, V.B., CHERMIN, L.S.:
Rolle der Glucocorticoid-Hormone in der Pathogenese des experimentellen Rheumatismus.
Vopr. revmat., Moskwa, 4, 7 (1964)

[40] WEISSEFELS, I., BOLL, I.:
Einwirkung von Corticosteroiden (Prednisolonacetat und Triamcinolon) auf menschliches Knochenmark in vitro
Klin. Wschr. 51, 907 - 914 (1973)

[41] ZICHA, L., SCHEIFFARTH, F., GRAU, E.:
Arzneimittel Forsch., 11, 606 (1961)

AN DIESER STELLE MÖCHTE ICH
FRAU PROFESSOR DR. MED. IRENE BOLL
FÜR DIE ÜBERLASSUNG DES THEMAS
UND IHRE STETIGE UND GROSSZÜGIGE
UNTERSTÜTZUNG DANKEN

L e b e n s l a u f

Am 21.9.44 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Erich Wilde und seiner Ehefrau Käthe, geb. Ludwig, in Berlin-Pankow geboren.

Von 1951 - 1959 besuchte ich dort die 3. bzw. 7. Grundschule, wechselte dann zur Frithjof-Nansen-Schule (techn. Zweig) in Berlin-Wedding und von dort 1962 zur Robert-Koch-Schule (Gymnasium) in Kreuzberg, an der ich 1965 meine Reifeprüfung ablegte.

Im gleichen Jahr begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Medizin. Im Jahre 1966 habe ich das Vorphysikum und nach Studiumwechsel zur Zahnmedizin 1968 das Physikum bestanden.

Das zahnmedizinische Staatsexamen wurde von mir im Frühjahr 1971 erfolgreich abgeschlossen.